

(19) Japanese Patent Office (JP)

(11) Publication number:

**(12) Publication of Examined
Patent Application (B)**

H7-111435 [1995]

24) (44) Publication date: November 29, 1995

(51) Int.Cl. ⁶	ID symbol	JPO file No.	FI	Technology designation
G 01 N	33/543 595 21/47	A		
				Number of claims: 8 (11 pages in all)
(21) Application number	S63-8569 [1988]	(71) Applicant	999999999	
(22) Filing date	January 20, 1988		Applied Research Systems ARS	
(65) Disclosure number	S63-271162 [1988]		Namurozebenootosuhappu	
(43) Disclosure date	November 9, 1988	(72) Inventor	6 Horushirawehi, Yohanbee	
(31) Priority declaration number	8701293		Curacao, Dutch Antilles	
(32) Priority date	January 21, 1987		Rosemary Ann Lucy Drake	
(33) Priority declaration country	Great Britain (GB)		The Old Vicarage	
(31) Priority declaration number	8725797		7 May Street	
(32) Priority date	November 4, 1987		Great Chishiru, Royston	
(33) Priority declaration country	Great Britain (GB)	(74) Agent	Hertfordshire, SG8 8SN, Great Britain	
				Akira Aoki, patent attorney (and 4 others)
				Examiner Hiroyuki Kameta
Continued on last page				

(54) [Title of invention] Measurement method using surface plasmon resonance

[Claims]

[Claim 1] Being a method for measuring a ligand in a sample, a measurement method that is characterized in that this method includes incubating, either simultaneously or in arbitrary order,

a) said sample,

b) reagent X, and

c) reagent Y, which is fixed directly or indirectly to the surface of an optical structure that can exhibit surface plasmon resonance, monitoring the surface plasmon resonance effect that is exhibited by said optical structure during the measurement period, using the results to detect changes in the optical thickness of said surface, and obtaining the measurement results for said ligand;

here one of reagents X and Y includes a binding partner that is specific to said ligand and the other of reagents X and Y includes a binding

partner that is specific to a ligand analog or said ligand; and said reagent X is selected so that said surface has a significantly more reinforced optical thickness if a direct or indirect complex between said reagents X and Y is present than if said complex is not present.

[Claim 2] A method as described in claim 1 in which reagent Y is a ligand analog, and X is a binding partner that is specific to said ligand and is coupled to an optical thickness reinforcing agent as circumstances require.

[Claim 3] A method as described in claim 1 in which reagent Y is a binding partner that is specific to the ligand, and reagent X is a ligand analog that is coupled to an optical thickness reinforcing agent.

[Claim 4] A method as described in claim 1 in which] reagent Y is a binding partner that is specific to the ligand, and reagent X is a binding partner that is specific to the ligand and ... either the same as or different from reagent Y ... [page ends]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-111435

(24) (44) 公告日 平成7年(1995)11月29日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543 21/47	5 9 5 A			

請求項の数 8 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願昭63-8569	(71) 出願人	999999999 アブライド リサーチ システムズ エー アールエス ホールディング ナームロゼ ベノートスハップ オランダ領アンティル, クラカオ, ヨハン ベー, ホルシラウェヒ 6
(22) 出願日	昭和63年(1988)1月20日	(72) 発明者	ローズマリー アン ルーシー ドレイク イギリス国, エスジー 8 8 エスエヌ, ハ ートフォードシャー, ロイストン, グレー トチシル, メイ ストリート 7 ジ オ ールド ビカレイジ
(65) 公開番号	特開昭63-271162	(74) 代理人	弁理士 青木 朗 (外4名)
(43) 公開日	昭和63年(1988)11月9日		
(31) 優先権主張番号	8 7 0 1 2 9 3		
(32) 優先日	1987年1月21日		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(31) 優先権主張番号	8 7 2 5 7 9 7		
(32) 優先日	1987年11月4日		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		

審査官 亀田 宏之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン共鳴を用いる測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中のリガンドの測定方法であっ

て、この方法は、

a) 前記サンプル、

b) 試薬X、及び

c) 表面プラズモン共鳴を示すことができる光学構造体の表面上に直接的又は間接的に固定化された試薬Y、を同時に、又は任意の順序でインキュベートし、そして測定期間中前記光学構造体によって示される表面プラズモン共鳴効果をモニターし、その結果を用いて該表面の光学的厚さの変化を検出して前記リガンドの測定結果を得ることを含んで成り、

ここで試薬X及びYの1つは前記リガンドに対する特異的結合パートナーを含んで成り、そして試薬X及びYの他方はリガンド類似体又は前記リガンドに対する特異的

結合パートナーを含んで成り、そして前記試薬XとYとの間の直接的又は間接的複合体が存在しない場合に比べて該複合体が存在する場合に前記表面が有意に増強された光学的厚さを有するように前記Xが選択されている、ことを特徴とする測定方法。

【請求項2】 試薬Yがリガンド類似体であり、そしてXが前記リガンドに対する特異的結合パートナーであり、場合によっては光学的厚さ増強剤に連結されている、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 試薬Yがリガンドに対する特異的結合パートナーであり、そして試薬Xが光学的厚さ増強剤に連結されたリガンド類似体である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 試薬Yがリガンドに対する特異的結合パートナーであり、そしてXがリガンドに対する特異的結合パートナーであって、試薬Yと同一であるか又は異って

おり、場合によっては光学的厚さ増強剤に連結されている、請求項1に記載の方法。

【請求項5】試薬Xが形成された複合体の大きさを少なくとも100nm増加せしめる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】試薬Xが2.0以上の屈折率を有する、請求項1又は5に記載の方法。

【請求項7】前記光学構造体が回折格子である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】請求項1～7項のいずれか1項に記載の方法を実施するためのキットであって、請求項1に定義される試薬X、及び請求項1に定義される試薬Yがその表面上に固定化される光学構造体を含んで成るキット。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は測定方法、及び該方法を実施するための手段に関する。この発明は特に、増強された感度及び特異性を提供する改良された測定方法に関する。

【従来の技術】

簡単な光学構造体の性質は古くから知られており、そして例えば回折格子のごとき構造体は電磁放射の波の性質を理解しそして分析するための道具としてのみならず、一層最近では、サンプル中の化学的、生化学的又は生物学的種を検出するためのセンサーとしても広範に使用されている。

EP-0112721は、測定されるべき種（以後、“リガンド”と称する）と結合することができる物質（以後、“特異的結合パートナー”と称する）がコートされたあらかじめ形成された起伏状態を有する光学構造体の調製、及びバイオセンサーとしての使用を記載している。このような構造体の光学的性質はリガンドと特異的結合パートナーとの間の複合体の形成の結果として変化し、その結果この現象は測定系の基礎を構成する。

上記の構造体の光学的性質の変化は、結合したリガンドの質量又は嵩、それらの誘電特性、並びにそれらの光学的特性、例えば屈折率及び透明度の関数である。従って、センサーを構成するために表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance; SPR）のごとき攪乱（perturbance）された光学的性質を用いる基本概念は有効であるが、小さな、小分子量子リガンドに対する低い感度のため、この様な方法の実際の適用は従来から限定されている。この低い感度のため、例えば10,000ダルトンより小さい分子量を有する低分子量子リガンドの臨床濃度における正確な測定が実現不能である。

EP-0112721に記載されている技法の実際的な適用において経験される他の困難は低い特異性である。このことは、アッセイ方法の2つの別個の段階において起こる。

i) 光学構造体の表面へのサンプル成分の非特異的結合。これは偽陽性結果、及び特異的結合の結果として生ずる光学的性質の攪乱（perturbation）の不正確な定量をもたらすことがある。

ii) 単一の認識段階の使用、すなわち分析されるべきリガンドについてのただ1つの特異的結合対の使用が特異性を低下せしめる場合がある。すなわち、サンプル中にリガンドが無傷のユニット及び断片の両者として存在する場合、例えば副甲状腺ホルモンの場合、無傷の、そしてそれ故に生化学的に活性な分子のみを測定することが望ましい際に単一の認識段階は両形態が結合する結果をもたらすであろう。

（発明が解決しようとする課題）

本発明者等は今や、従来技術の感度の欠点を克服することができ、そして幾つかの態様においてはさらに改良された感受性をもたらす改良された測定技法を考案した。従って本発明は、サンプル中のリガンドの測定方法であって、

a) 前記サンプル、

b) 試薬X、及び

c) 表面プラズモン共鳴を示すことができる光学構造体の表面上に直接的又は間接的に固定化された試薬Y、を同時に、又は任意の順序でインキュベートすることを含んで成り、ここで試薬X及びYの1つは前記リガンドに対する特異的結合パートナーを含んで成り、そして試薬X及びYの他方はリガンド類似体又は前記リガンドに対する特異的結合パートナーを含んで成り、試薬Xは、試薬XとYとの間の直接的又は間接的複合体の形成が、試薬Xの非存在下で支配的である光学表面の光学的厚さに比べてかなり増加した光学的厚さを有する光学表面をもたらすようなものであり、

該方法は、光学構造体により示される表面プラズモン共鳴が前記複合体形成によって変化するかどうか、そして所望により該変化の程度及び／又は速度を測定する段階を含んで成る方法を提供する。試薬X及びYの一方はリガンド類似体を含んで成り、そしてリガンドX及びYの他方はリガンドに対する特異的結合パートナーを含んで成り、リガンドX及びY間の複合体の形成が直接生ずるであろう。両試薬X及びYがリガンドに対する特異的結合パートナーを含んで成る場合、もしサンプル中にリガンドが存在すれば、試薬X及びY間の該リガンドを介する間接的な複合体の形成が起こるであろう。

試薬Yは光学構造体の表面に直接又は間接に固定化され得ることが理解される。例えば、試薬Yが抗体であれば、光学構造体の表面にそれ自体結合する、試薬Yに対する抗一種抗体により、間接固定化が行われるであろう。

この明細書において、“表面プラズモン共鳴を示すことができる光学構造体”なる語は、波長の所定のバンドにわたる放射に関して光学的に活性であり、そして構造体の表面特性に決定的に依存する表面プラズモン共鳴を示すすべての構造体を定義する。好ましくは、この構造体はあらかじめ形成された表面起伏形状を有し、そして金属性回折格子の使用が特に好ましい。しかしながら、表

面プラズモン共鳴効果を示す他の光学構造体、例えば金属コートプリズムもまた本発明の方法において使用される。

このような光学構造体の表面プラズモン (SPR) 特性は、構造体を電磁放射、好ましくは単色放射、さらに好ましくは偏光へ暴露せしめそして反射され又は透過した放射をモニターすることにより観察することができる。回折格子の使用及び該格子の線に対して横断する平面内で偏光する光の形で照射が特に好ましい。

この明細書において使用する“リガンド類似体”なる語は、測定されるリガンドのものと同一特異的結合パートナーの同じ結合部位と複合体を形成することができる種を意味し、そして特にその範囲内で既知量の測定対象リガンドを包含する。

この明細書で使用する場合、“光学的厚さ”なる語はその物理的厚さとその屈折率の両方の関数である材料の複合光学特性を定義する。それにリガンド-特異的結合パートナー複合体が結合する光学構造体例えば回折格子の SPR 効果は結合した複合体の光学的厚さに厳密に依存することが見出された。すなわち、リガンド-特異的結合パートナー複合体の形成により導入される光学構造体の SPR 効果の変化は、リガンド濃度の増加を伴わないで結合層の光学的厚さを増加することにより増強され得る。この明細書において、“光学表面”なる語は、光学構造体自体の表面のみを当然に意味するのではなく、文脈から適当な場合には光学構造体の表面上に存在するすべての材料 (例えば固定化された複合体) を包含する。

複合体の形成から生ずる光学表面の光学的厚さの増加は、結合された複合体の物理的サイズ又は結合した複合体の屈折率を大きくする試薬を試薬 X として用いることにより達成される。典型的には、複合体のサイズの増加は 100nm 以上のオーダーであり、あるいは屈折率は 1.5~2.0 に増加するであろう。前記のように、試薬 X はリガンド類似体、又は分析対象リガンドに対して特異的な結合パートナーを含んで成る。しかしながら、試薬 X は、試薬 X 及び Y 間のあらゆる複合体形成 (直接的又は間接的) (光学構造体の表面上に結合した複合体を導く) が前記のように光学表面のかなり増加した光学的厚さをもたらすようなものでなければならない。リガンド類似体又は特異的結合パートナーが、これを達成するためにそれ自体十分に大きくない場合、試薬 X は光学的厚さ増強剤、例えばポリスチレンラテックス、ウイルス、微生物、フェリチン、又は蛋白質、例えば第二の特異的結合パートナーへの連結によって“ラベルされた”リガンド類似体又は特異的結合パートナーであろう。

この発明の測定法の感度は、高屈折率 (μ) を有する適当な粒子、例えばガラスビーズ $\mu > 0.2$ 、特に $\mu > 2.2$ を有するリチウムニオブガラスを含有する試薬 X の使用によってさらに増強されよう。このような試薬は結合した複合体のサイズ及び屈折率の両者を増加せしめ、そして

光学表面の付随する増加がこの発明の測定法のなお一層の改良を可能にする。

この発明の測定方法は、

- 1) 試薬 Y がリガンド類似体であり、そして試薬 X がリガンドに対する特異的結合パートナーであり、場合によっては光学的厚さ増強剤に連結されているような方法；
 - 2) 試薬 Y がリガンドに対する特異的結合パートナーであり、そして試薬 X が光学的厚さ増強剤に連結されているリガンド類似体であるような方法；あるいは、
 - 3) 試薬 Y がリガンドに対する特異的結合パートナーであり、そして試薬 X がリガンドに対する特異的結合パートナー (試薬 Y と同一であるか、又は異なる) であり、場合によっては光学的厚さ増強剤に連結されているような方法；
- を包含する。

従って、試薬 X は任意の適当に大きなリガンド類似体、又はリガンドに対する特異的結合パートナーを含んで成ることができる。すなわち、例えば、リガンドが抗原である場合、X はそれに対する比較的大きな抗体であることができ、このものは場合によっては試薬 X の光学的厚さ増強性をさらに高める 1 又は複数の他の成分に結合している。あるいは、試薬 X はその表面にサンプル抗原 (リガンド) に類似する少なくとも 1 個の抗原決定基を有する成分であって、固定化された試薬 Y により提供される特異的結合部位に対するサンプル抗原 (リガンド) と試薬 X との間の競争が起こり得るようなものでもよい。

前記のような場合によっては 1 又は複数の光学的厚さ増強成分又は粒子に結合している、リガンドに対する第二の特異的結合パートナーの試薬 X としての使用は、この発明の方法の感度を改良するのみならず、前記のようにその特異性をも改良するであろう。すなわち、測定されるべきリガンドが抗原又は抗体である場合、場合によっては 1 又は複数の他の成分、例えばガラスビーズに連結されている抗体又はそれに対して特異的な抗原を光学的厚さ増強試薬 X として使用することは特に好ましい。

この発明の方法は、SPR 効果攪乱技法を用いて測定され得るリガンドの範囲を、 2×10^8 ダルトンの分子量を有するウイルスから、ステロイド、薬剤等のとき低分子量、例えば 200~500 ダルトンを有するリガンドに至る広い範囲に拡大する。従って、このタイプの測定技法はもはやリガンド自体の物理的サイズにより限定されない。この発明の変法は“競争型”測定に適用することができる。すなわち、例えば、光学表面の光学的厚さは、ラテックスのとき比較的大きな“ラベル”粒子に連結されたリガンド類似体を試薬 X として使用して増加せしめることができる。リガンドに対する特異的結合パートナーを担持する光学構造体の表面に、測定されるべきリガンドを含有するサンプルと一緒に試薬 X を導入することにより、試薬 Y により提供される結合部位に対する試薬 X

とリガンドとの競争が許容される。試薬X及びYの間の複合体が、サンプル中のリガンドの濃度に逆比例する量で形成されるであろう。

あるいは、試薬Xは測定されるべきリガンドに対する特異的結合パートナーによりコートされた大“ラベル”粒子から成ることができ、そしてこの試薬Xをサンプル、及び固定化されたリガンド類似体（試薬Y）によりコートされた光学構造体と共にインキュベートすることができ、この結果試薬X及びYの間で形成された複合体の量はやはりサンプル中のリガンドの濃度に逆比例する。

この発明の他の態様においては、大きな“ラベル”成分をいわゆるサンドイッチアッセイにおいて使用することができる。この場合には、リガンドは、光学構造体の表面に固定化された特異的結合パートナー（試薬Y）、及び光学的厚さ増強成分の表面上に担持された同一の又は異なる第二の特異的結合パートナー（試薬X）の両者と結合することができる。存在すればサンプルリガンドが試薬Xと試薬Yとを連結し、三成分すべての間の複合体をもたらす。

この発明の他の具体例においては、大きな凝集を可能にして試薬X及びYとの間のその後の複合体を形成せしめることにより、結合層の光学的厚さの増強を達成することができる。

この発明の他の観点に従えば、アッセイを行うためのキットが提供され、このキットは前に定義した試薬X、及び前に定義した試薬Yがその表面上に固定化されている光学的構造体を含んで成る。

試薬X及びYの間の複合体の形成による光学構造体の光学的厚さの増強はSPR効果をモニターすることにより検出される。光学構造体が金属化回折格子であるこの発明の好ましい具体例においては、該格子の線に対して横断的な平面内で偏光された光を格子表面に向け、そして複合体の形成により変化した表面プラズモン共鳴効果の変化を検出する。すなわち、反射又は回折された光の強さの急激な低下が存在する入射角を測定することができる。この急激な低下は、光エネルギーが格子の表面にカップリングして、そして格子表面の光学特性、そして特に光学表面の光学的厚さに依存する特定の角度において表面プラズモン共鳴を惹起することにより生ずる。別の方法として、入射角が一定に保持されそして放射光の波長が変化して、表面の変化したSPR特性が検出される。

この発明は後で、特にリガンドとして抗体又は抗原に言及しながら記載される。しかしながら、この発明は抗体又は抗原の測定に限定されると解してはならない。この発明の方法により測定され得るリガンドの例を、各場合に適当な特異的結合パートナーと共に次の第1表に示す。

第 1 表

リガンド	特異的結合パートナー
抗原	特異的抗体
抗体	抗原
ホルモン	ホルモン受容体
ホルモン受容体	ホルモン
ポリヌクレオチド鎖	相補的ポリヌクレオチド鎖
アビジン	ビオチン
ビオチン	アビジン
プロテインA	免疫グロブリン
免疫グロブリン	プロテインA
酵素	酵素コファクター(基質)又は阻害剤
酵素コファクター(基質)又は阻害剤	酵素
レクチン	特異的炭水化物
レクチンの特異的炭水化物	レクチン

この発明の方法は非常に広範囲の用途を有するが、特に、ホルモン類、例えばペプチドホルモン、例えば甲状腺刺激ホルモン（TSH）、黄体形成ホルモン（LH）、ヒト絨毛ゴナドトロピン（hCG）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、インシュリン及びプロラクチン、又は非ペプチドホルモン、例えばステロイドホルモン、例えばコルチソール、エストラジオール、プロゲステロン及びテストステロン、又は甲状腺ホルモン、例えばチロキシン（T₄）及びトリヨードチロニン、蛋白質類、例えば癌胎児性抗原（CEA）及びアルファフェトプロテイン（AFP）、薬剤、例えばジゴキシン（digoxin）、糖類、毒薬類、ビタミン類、ウイルス類、例えばインフルエンザウイルス、バラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、肝炎ウイルス、呼吸器ウイルス及びAIDSウイルス、あるいは微生物、の測定のために使用することができる。

この明細書において“抗体”なる語は、その範囲内に次のものを含む。

(a) 常用されるすべての動物、例えばヒツジ、ラビット、ヤギ又はマウスに由来するすべてのクラス又はサブクラスの免疫グロブリン、例えばIgG、IgM;

(b) モノクローナル抗体;

(c) 抗体、すなわちモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の完全な分子又は“断片”。この断片は抗体の結合領域を含むもの、すなわちFc部分を欠く断片（例えばFab, Fab', F(ab')₂）、又は完全な抗体中で重鎖成分を連結するジスルフィド結合の還元開裂により得られるいわゆる“半分子”断片である。

抗体の断片の調製方法は当業界においてよく知られている。

この明細書において使用する“抗原”なる語は、永久的抗原種（例えば、蛋白質、細菌、細菌断片、細胞、細胞

断片及びウイルス)、及び適当な条件下で抗原性となるハプテンを包含すると理解されよう。

下記の一般的測定方式は本発明の特定の具体例を示す。

凝集技法

抗体は典型的には二価であり、そして蛋白質のごとき大きな抗原はしばしば多価である。従って、1個の抗体が同一の又は異なる2個の抗原に同時に結合することができる。あるいは複数の抗体が1個の抗原に結合することができる。抗原及び抗体が溶液中で混合された場合、直接的抗原-抗体反応がまず小複合体の形成を導く。抗体結合部位の数が抗原結合部位の数に近い場合、抗体と抗原との間の大規模な架橋が起こり大きな凝集を促進せしめることができる。

第1図は、測定されるべき種、すなわち抗原14に対して特異的な抗体12(試薬Y)がその上に固定化されている回折格子10の表面を模式的に示す。次に、抗原14を含有するサンプル、抗原14に結合することができ(そして抗体12と同一でも同一でなくてもよい)特異的な抗体16の形の試薬X、及び前記格子10を同時に、又は任意の望ましい順序で接触せしめ、形成された大きな抗体-抗原凝集体を抗体12を介して格子の表面に結合せしめる。格子上に形成された抗体/抗原複合体の数を表面のSPR特性の変化により検出することができる。

溶液中での凝集体の形成の時間的経過は急速であるが、しかしポリエチレングリコールのごとき追加の試薬を使用して免疫沈澱を促進することができる。従って、SPR効果を増強するために適当な回折格子の表面で凝集体を形成するためにこの方法を使用することは一層長いインキュベーション時間をもたらさず、又は回折格子を基礎とする測定に追加の処理段階を加えない。例えば、試薬Xすなわち図中16(特異的な抗体)をサンプルに加添し、そして数分間凝集体を形成せしめた後、こうして増強されたサンプルを、サンプル抗原14に対して特異的な抗体12(試薬Y)をその表面に固定化して担持する試験回折格子に適用することができる。

別の方法として、凝集体を試験回折格子の表面で直接形成せしめることができ、そして該表面のSPR効果の変化を、凝集の形成が進行するに従って経時的にモニターすることができる。このタイプの測定系の他の変法は常用のイムノアッセイ系に基礎を置き、この方法においては、例えば、薬物のごとき小分子により凝集体の形成が阻害される。

粒子ラベル

次の例は、規定されたサイズ並びに化学的及び光学的性質を有する1又は複数の粒子に連結された、リガンドに対する特異的な結合パートナー又はリガンド類似体を含んで成る試薬Xを使用する。サンプルリガンド類似体又はリガンドに対する特異的な結合パートナーではなく、粒子自体がSPR効果により直接測定される主たる成分である。

適当な粒子ラベルは小粒子、例えば100nmの直径の粒子の形成のために適当な材料を含んで成り、入射光が結合した粒子を通過するように比較的透明であり、そして好ましくは高屈折率を有し、さらに好ましくは2.0より大きい屈折率を有し、これによって表面プラズモン効果が増強される。粒子の表面は、要求されるリガンド類似体、又は特異的な結合パートナー、例えば抗原もしくは抗体を、それに対して固定化することを許容する適当な材料から作られるべきである。合成粒子は、例えばポリマー材料、例えばラテックス、ガラス、特にリチウムニオブガラス、コロイド状銀又は金、金属酸化物又はフェリチンを含むことができ、そして天然粒子は細胞、例えば微生物、ウイルス、澱粉粒及び花粉粒を包含する。

このような粒子ラベルを使用することができそして当業界においてよく知られている常用のイムノアッセイ技法に基礎を置き、それ自体はこの明細書中で検討していない幾つかの測定方式が存在する。

a) 競争的測定方式

薬物やホルモンのごとき小分子は、競争的測定方式を用いて多数の異なる方法で測定することができる。

第2図に関し、反応体Xはその表面上に抗原20(これはサンプル抗原24と同一でもよく、同一でなくてもよい)を担持するラベル粒子18を含んで成る。反応体Yは回折格子10の表面上に固定化された特異的な抗体22を含んで成る。サンプル抗原24及び試薬Xが格子試験ストリップと共にインキュベートされる場合、抗原22への結合についての競争がサンプル抗原24と、粒子18に結合した抗原20との間で起こる。試験格子10の表面に結合した粒子18の量はサンプル抗原24の濃度と逆比例し、サンプル抗原24の測定が可能であろう。

第3図は、他の競争的測定法を示す。この場合、回折格子10は、固定化された抗原28(これはサンプル抗原34と同一でもよく、又は同一でなくてもよい)を含んで成る試薬Yを担持し、そして試薬Xはサンプル抗原34及び固定化された抗原28に特異的な抗体32を担持するラベル粒子30を含んで成る。サンプル抗原34及び固定化された抗原28は抗体32上の結合部位について競争し、試験格子10の表面に結合した試薬Xの量がサンプル抗原の濃度に逆比例するであろう。

b) サンドイッチ測定方式

この方式は、抗体により認識されそして結合され得る1個より多くの部位をその表面に担持するために十分に大きな抗原に適用することができる。これらの抗原は少なくとも2種類の抗体に同時に結合することができ、そしてそれ故に抗体間を架橋することができる。

第4図に関し、二価サンプル抗原34の場合において、試験格子10の表面に結合した抗体36(試薬Y)と試薬Xを構成するラベル粒子40の表面に結合した他の抗体38(これは抗体36と同一でもよく、又は同一でなくてもよい)の間で架橋が形成される。次に、結合した試薬Xの量が

決定され、従ってサンプル抗原34の測定が可能となる。サンプル抗原の濃度の増加が結合した試薬Xの量の増加を生じさせる。

第5図は他のタイプのサンドイッチ測定を示し、この方法においては多価サンプル抗原が測定される。多価サンプル抗原60が試験格子10の表面に結合した抗体62（試薬Y）と抗原64（これは抗体62と同一であるか、又は同一でない）を含んで成る少なくとも1つの試薬Xとの間の橋を形成する。従って結合したサンプル抗原60の有効サイズが増加し、サンプル抗原60の一層鋭敏な測定が可能となる。

c) 凝集測定方式

この発明の前記の具体例は、サンドイッチ型イムノアッセイにおける抗体-抗原-抗体複合体の形成がいかにして測定の感度及び特異性を増強し得るかを説明している。これらの測定の感度をさらに増強するために粒子を使用することができる。測定は直接凝集又は凝集阻害方式を用いることができる。後者は、前記のような競争的測定方式において小分子を測定するため使用される。サンプル抗原又は抗体の存在下で生成する大粒子凝集体を、特異性結合パートナー（試薬Y）の手段により回折格子の表面上に捕捉することが提案される。一例において、ラベルされた粒子の形の試薬Xがサンプルに加えられ、そしてリガンドが、もしそのサンプル中に存在するとすれば、凝集を惹起するであろう。試験格子への粒子で増強されたサンプルの添加が、表面への凝集体の捕捉を可能にし、この表面でそれらが測定されるであろう。あるいは、試薬X、サンプル、及び回折格子に付着された試薬Yの接触は、逐次的ではなく同時的であることができ、そして格子の表面への凝集体の形成の速度を測定して測定対象リガンドを測定することができる。

第6図は凝集測定方式を模式的に示す。不活性支持体粒子38は抗体40を担持し、この抗体がサンプル抗原42と結合する。生ずる大凝集体44が、格子10の表面上に固定化された抗体46（これは抗体40と同一でもよく、又は同一でなくてもよい）により回折格子10の表面に結合される。抗体46が大凝集体の抗原42に結合し、そして次にサンプル抗原42の量を測定することができる。

複合体沈澱アッセイ

アルギン酸塩又はキトサンのごとき炭水化物ポリマーは、可溶性ポリマーとして又は不溶性ポリマーとして、異なる形態で存在することができる。1つの形から他の形への移行はある種のイオンの添加により行われ得る。例えば、Ca²⁺は不溶性アルギン酸塩を沈澱せしめる。この明細書中に記載するSPR測定を強化するためにこの効果を使用することができることが提案される。例えば、試薬Xはリガンドによりラベルされた長鎖ポリマーであることができる。この試薬は、格子表面上の特異抗体（試薬Y）への結合についてサンプルリガンドと競争することができる。結合の後、結合したポリマーを沈澱せしめ

るための展開溶液を測定の前の加える。

例えば第7図に関し、長鎖ポリマー50が抗原52（サンプル抗原54と同一でもよく、又は同一でなくてもよい）によりラベルされる。このラベルされた抗原は、格子表面に固定化された抗体56上の結合部位について、“遊離”サンプル抗原54と競争する。次に、展開溶液を加えて結合したラベルされた抗原（第7図b、58）を沈澱せしめる。結合しそして格子10の表面に沈澱したラベル化抗原58の量はサンプル抗原54の濃度に逆比例する。

同様に、この様な沈澱性ポリマーを用いてサンドイッチ方式のアッセイを開発することができる。

次に、例によりこの発明をさらに具体的に説明するが、これによりこの発明の範囲を限定するものではない。

例1. インフルエンザAウイルスの検出におけるラベルとしての第二抗体の使用

出発材料の調製

1. 抗-インフルエンザモノクローナル抗体

Milstein及びKohler, Nature 256, 495-497 (1975) により報告された方法により、マウス腹水液からモノクローナル抗体を得た。個々のハイブリドマセルラインからの抗体をスクリーニングして、インフルエンザAウイルスの別々の抗原決定基に対する抗体を生産するセルラインを同定した。インフルエンザAウイルス、X-31株に対して最高の親和性を有する抗体を選択して測定において使用した。捕捉抗体（抗体A）を、0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）（シグマ・ケミカルズ社、イングランド）を含有するリン酸緩衝塩（PBS）中で50 µg/mlで使用し、そしてラベル抗体（抗体B）をPBS中50 µg/mlで使用した。

2. インフルエンザAウイルスX-13株の調製

インフルエンザAウイルスX-13株を標準的方法で増殖せしめた（例えば、“Diagnostic Procedures For Viral, Rickettsial and Chlamydia Infections, 第5版”、E.H. Lennette及びN.J. Schmidt, American Public Health Association, 1979により発行、593-594頁を参照のこと）。ウイルスを、ポリエチレングリコールによる沈澱の後、シュクロース密度勾配遠心により精製した。使用に先立って、ウイルスを0.1%BSA含有PBS中に稀釈した。

3. 金属化回折格子の調製

回折格子（633nmピッチ、35nm深さ）を射出成形によりポリカーボネートで製造した。次に、この格子を10nmの厚さのクロム層でコートし、次に100nmの厚さの金でコートした。両金属は真空下での熱蒸発により沈着せしめた。

4. 表面プラズモン共鳴（SPR）現象の測定装置

表面プラズモン共鳴は第8図中に示される装置を用いて発生せしめた。この装置は、抗体でコートされた回折格子を照射する平面偏光された白色光の平行ビームを用いる。次に、この光は鏡を介して前記の抗体コート回折格

子からブレース回折格子に向けられ、ここで光はその波長成分に分けられ、そして256ピクセル光ダイオード列に集中される。この光ダイオード列は特定の波長において光強度を測定する。

インフルエンザAウイルスを検出するための実験手順
清浄な金コート回折格子を装置に入れ、そしてウードの異常 (Wood's anomaly) (回折格子の表面プラズモン共鳴の発生によりもたらされる反射光強度の最小) の波長を記録した。抗体A又は0.1%BSA含有PBSの250 μ lのアリコートを一ビベットにより格子の表面に置き、抗体を固定化した。これらのストリップを湿潤雰囲気中で37 $^{\circ}$ Cにて60分間インキュベートした。ストリップをPBSで清浄した後、ウイルスの稀釈物又は稀釈剤の250 μ lのアリコートをストリップに適用し、そして湿潤雰囲気中でわずかに攪拌しながら (85rpm) 37 $^{\circ}$ Cにて2時間インキュベートした。PBSによりさらに洗浄した後、抗体B又は稀釈前の250 μ lのアリコートをストリップに適用し、そして湿潤雰囲気中でわずかに攪拌しながら (85rpm) 37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした。ストリップをPBSで洗浄し、そして次に蒸留水で洗浄した。空気乾燥の後、ウードの異常 (Wood's anomaly) を各ストリップについて読み取った。

第9図は、免疫的に活性な回折格子に結合するインフルエンザウイルスにより惹起されるウードの異常の変位、及び抗体がインフルエンザウイルス粒子に結合した場合に得られる増強されたシグナルを示す。

例2. ヒト血清中のインフルエンザウイルスに対する抗体を検出するための測定におけるラベルとしてのインフルエンザウイルスの使用

出発材料の調製

1. ウイルスヘマグルチニンの調製

例1に記載したようにしてインフルエンザAウイルス (X-30株) を増殖せしめそして精製した。Brand及びSkehel, Nature New Biology Vol. 238 (1972), 145-147頁に記載されているプロメライン法によりウイルスからヘマグルチニンを抽出した。

2. ヒト抗-インフルエンザ血清

インフルエンザAウイルスについての赤血球凝集阻害測定法において陽性のヒト血清及び陰性のヒト血清を、National Institute for Medical Research, Mill Hill, ロンドンから得た。血清を、0.1%BSA含有PBS中1/20, 1/160及び1/1280稀釈物として、測定において試験した。

3. インフルエンザAウイルスの調製

例1に記載したようにしてインフルエンザAウイルスを調製した。

4. 金属化回折格子の調製

金属化回折格子を例1に記載したようにして調製した。

5. 表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象の測定のための測定装置

この装置は例1に記載した通りであった。

ヒト血清中のインフルエンザAウイルスに対する抗体を検出するための実験手順

清浄な、金をコートした回折格子を装置に入れ、そしてウードの異常 (Wood's anomaly) (回折格子表面での表面プラズモン共鳴の発生によりもたらされる反射光強度の最小) の波長を記録した。ヘマグルチニン (PBS中50 μ g/ml) の250 μ lのアリコートを回折格子に塗布し、そして湿潤雰囲気中で37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした。PBSで洗浄した後、ストリップを湿潤雰囲気中37 $^{\circ}$ Cにて1時間、PBS中1%BSAと共にインキュベートした。PBSによりさらに洗浄した後、ヒト血清又は稀釈剤の250 μ lのアリコートを回折格子に適用し、そして湿潤雰囲気中でわずかに攪拌 (85rpm) しながら37 $^{\circ}$ Cにて2時間インキュベートした。PBSで洗浄した後、インフルエンザウイルス又は稀釈剤の250 μ lのアリコートを回折格子に適用し、そして湿潤雰囲気中でわずかに攪拌しながら (85rpm) 37 $^{\circ}$ Cにて2時間インキュベートした。次に格子をPBSで洗浄し、次に蒸留水で洗浄し、次に空気乾燥した後各ストリップについてウードの異常の位置を測定した。

第10図はウードの異常の位置の変位をナノメーターで示したものであり、ウイルス粒子ラベルの存在下及び非存在下での回折格子への陽性抗体及び陰性抗体の異なる稀釈物の結合により得られたものである。

例3. アビジンを検出するためのアッセイにおけるラベルとしてのフェリチンの使用

出発材料の調製

1. 生化学試薬の調製

スパーサー分子ジアミノジアルキルアミン (DAPA) を介して酵素パーオキシダーゼに接合したアビジン、アビジン、及びフェリチンラベルされたアビジンの接合体はシグマ・ケミカル社、ロンドンから得た。

アビジン-パーオキシダーゼ接合体は0.05M炭酸/炭酸水素緩衝液 (pH9.6) 中0.068mg/mlにし、そしてアビジン-フェリチン及びアビジンは0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解した。

2. 金属化回折格子の調製

金属化回折格子は例1に記載したようにして調製した。

3. 表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象の測定装置

この装置は例1に記載したものと同一であった。

実験技法

金コート回折格子の各々に0.4mlのビオチン溶液を加え、そして37 $^{\circ}$ Cにて1.5時間インキュベートした。炭酸/炭酸水素緩衝液で洗浄した後、格子に0.4mlの炭酸/炭酸水素緩衝液中0.1%BSAと共に37 $^{\circ}$ Cにて2時間インキュベートした。炭酸/炭酸水素緩衝液によりさらに洗浄した後、0.4mlの段階的に稀釈したアビジン又はアビジン-フェリチン溶液を格子に添加し、そして37 $^{\circ}$ Cにて2時間インキュベートした。次に、格子をリン酸緩衝液で選択し、次に蒸留水で洗浄した後空気乾燥し、そしてウ

ードの異状の位置を測定した。

第11図は、ビオチンコート回折格子へのアビジン及びアビジン-フェリチンの結合に後の、ウードの異状の位置の変位をナノメーターで示すものである。フェリチンの存在に基くシグナルの増加が明瞭に観察される。

【図面の簡単な説明】

第1図～第7図は本発明の方法の種々の態様を示す模式図である。

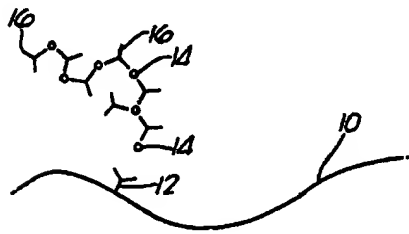
第8図は、本発明の方法において使用する光学系を示す模式図である。

第9図は、本発明の方法によりインフルエンザウイルスの濃度を測定する場合のグラフである。

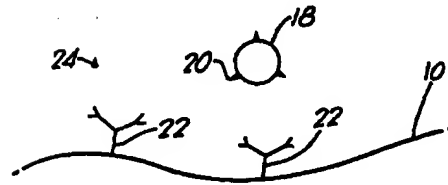
第10図は、本発明の方法により血清中のインフルエンザ抗体を測定する場合のグラフである。

第11図は、本発明の方法によりアビジン濃度を測定する場合のグラフである。

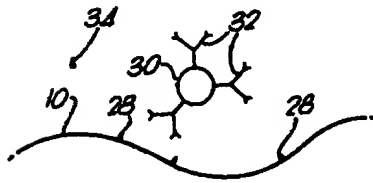
【第1図】



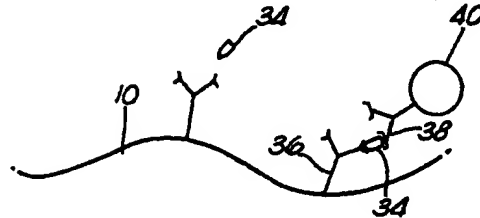
【第2図】



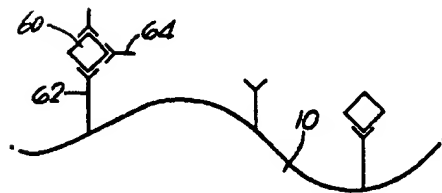
【第3図】



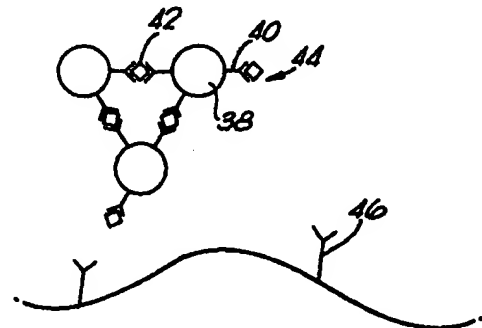
【第4図】



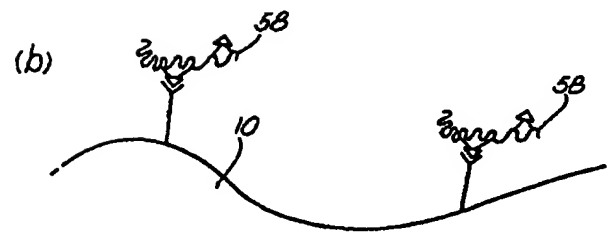
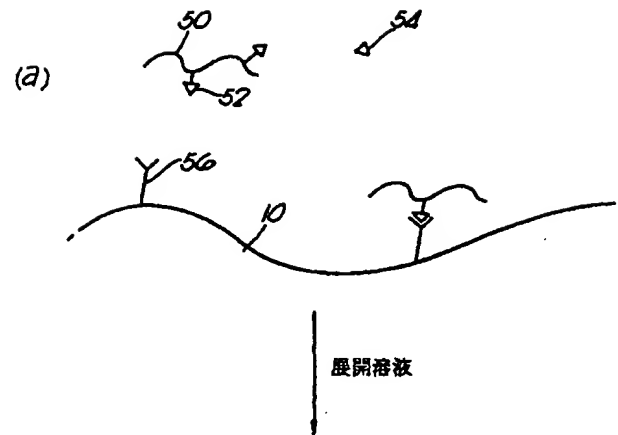
【第5図】



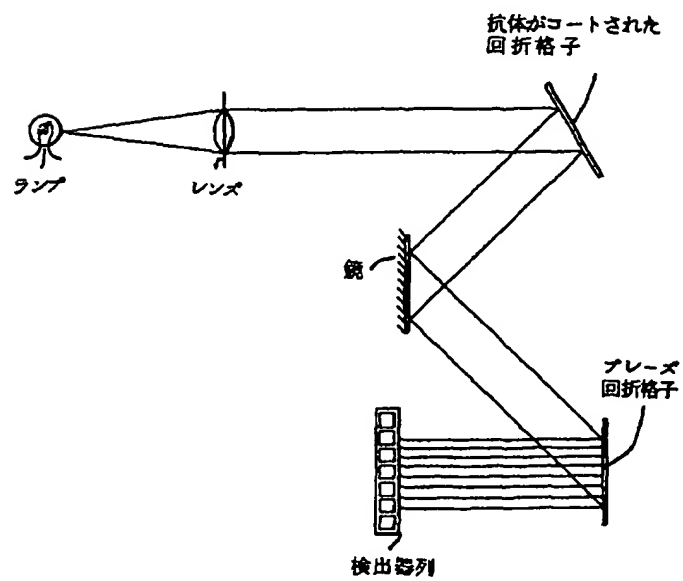
【第6図】



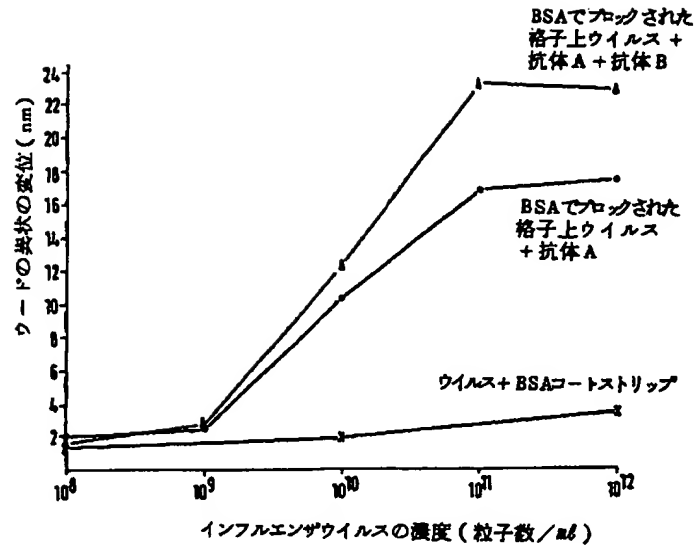
【第7図】



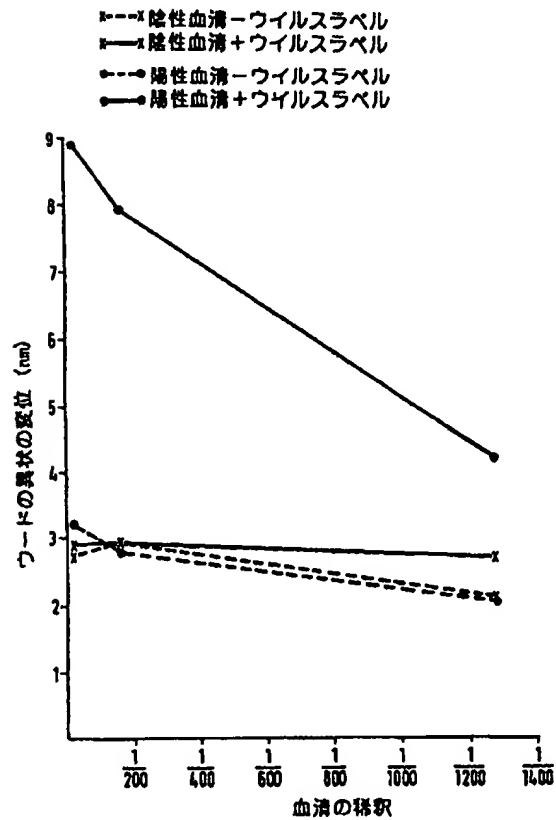
【第8図】



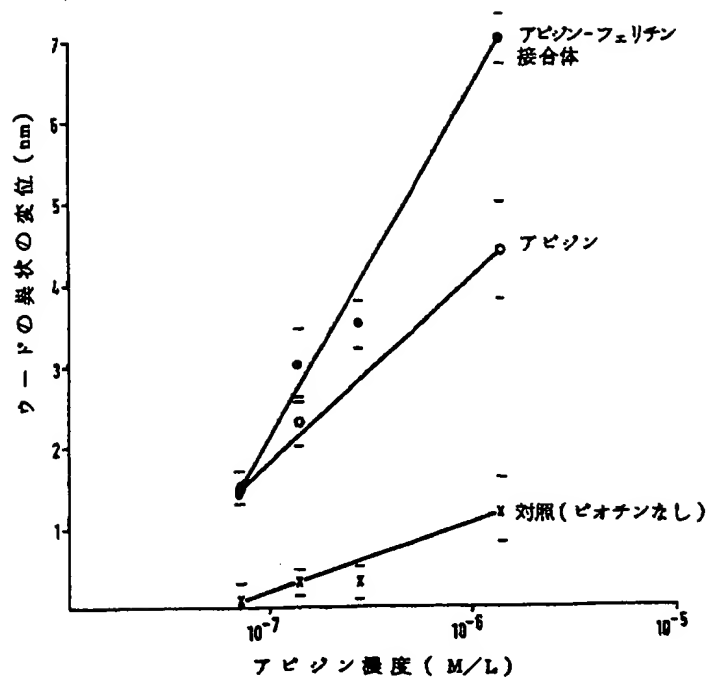
【第9図】



【第10図】



【第11図】



フロントページの続き

(72)発明者 クレイグ ジョージ ソーヤーズ
イギリス国、ケンブリッジシャー、セント
ニーオツ、エイネスバリー、ホウィッツレ
ー 11, ザ ローレルズ

(72)発明者 グレンビル アーサー ロビンソン
イギリス国、ロンドン ダブリュ13 9ワ
イイー、アーリング、バーンハム ウェイ
23

(56)参考文献 特開 昭61-292045 (J P, A)
国際公開86/01901 (WO, A)